

**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

4



EP99/8480

EPO - Munich
5

02 Feb. 2000

| | |
|----------------------|--------|
| RICEVUTO 16 FEB 2000 | |
| W.I.D.O. | P.C.T. |

INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. MI98 A 002443

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

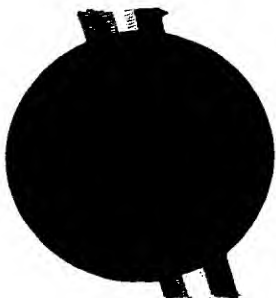
**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

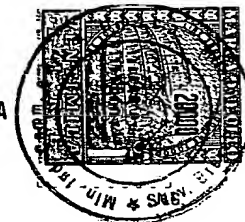
Roma, li 26 NOV. 1999

IL REGGENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

D.ssa Paola DI CINTIO





AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione AQUISITIO S.p.A. SP
Residenza Milano codice 08864050151
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.
via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) C08B gruppo/sottogruppo _____"Processo di reticolazione di polisaccaridi carbossilati"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Barbucci Rolando 3) _____
2) Sportoletti Giancarlo 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____
2) _____

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 12 PROV n. pag. 25 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) 10 PROV n. tav. _____ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) 11 RIS lettera d'incarico, procura XXXXXXXXXXXX
Doc. 4) 10 RIS designazione inventore
Doc. 5) 10 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) 10 RIS autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) 10 nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire Cinquecentosessantacinquemila#

obbligatorio

COMPILATO IL 11/11/1998

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Minoja FabrizioCONTINUA SI/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANOcodice 15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI98A 002443

Reg. A.

L'anno millenovecento

NOVANTOTTO

il giorno

UNDICI

del mese di

NOVEMBRE

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

00

fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

Bidia Michel
DEPOSITANTE

timbro
dell'Ufficio

CORTONESI MAURIZIO
UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MIS 8 A 00 2443

REG. A

DATA DI DEPOSITO

11/11/1998

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

D. TITOLO

"Processo di reticolazione di polisaccaridi carbossilati"

L. RIASSUNTO

Si descrive un processo per la preparazione di polisaccaridi reticolati contenenti gruppi carbossilici, comprendente:

- a) attivazione dei gruppi carbossili del polisaccaride per reazione con adatti reagenti carbossi-attivanti in solvente aprotico anidro;
- b) reazione del polisaccaride attivato ai gruppi carbossilici con una poliammina.

M. DISEGNO



5665 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

MAB/as "PROCESSO DI RETICOLAZIONE DI POLISACCARIDI CARBOSSILATI"

a nome : AQUISITIO S.p.A.

con sede in: Milano

MI 9 8 A 0 0 2 4 4 3

* * *

'11 NOV. 1998

Campo dell'invenzione

La presente invenzione ha per oggetto un processo di reticolazione di polisaccaridi carbossilati.

Il processo dell'invenzione è in grado di fornire elevata riproducibilità dei prodotti ottenuti, in termini di grado di reticolazione, omogeneità della distribuzione dei bracci reticolanti, e caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti e delle caratteristiche tecnologiche dei manufatti da essi derivati.

Tale riproducibilità è particolarmente importante per le applicazioni in campo medicale, farmaceutico e in dermocosmesi.

Ulteriore oggetto dell'invenzione sono i prodotti ottenuti con tale processo e le loro applicazioni in campo medicale, farmaceutico e dermocosmetico.

Sfondo dell'invenzione

L'uso di macromolecole nel campo farmaceutico/medicale e, più recentemente, in quello dermatologico-cosmetico, è ben consolidato. Macromolecole sono utilizzate nella preparazione di formulazioni farmaceutiche in qualità di addensanti, lubrificanti, agenti di rivestimento in film per gastroresistenza; in particolare per la

produzione di capsule, gel, colloidi, di devices diversi (ad es. lenti a contatto, garze etc.). Le macromolecole sono utilizzate anche nella preparazione di formulazioni a "rilascio controllato" di principi attivi.

Ampie recensioni del loro uso farmaceutico e delle loro caratteristiche sono reperibili in:

- 1) C. Hansch et Al. Editors - "Comprehensive Medicinal Chemistry" - Pergamon Press, Oxford, 1990 - Vol. 1-6.
- 2) A. Wade and P.J. Wellers Editors - "Handbook of Pharmaceutical Excipients" - Edizione 1994 - The Pharmaceutical Press.

Le macromolecole di cui sopra appartengono alle più svariate famiglie chimiche e possono essere totalmente di sintesi, naturali o semisintetiche.

Esempi di macromolecole sintetiche comprendono polivinilpirrolidone, poliossietilenalchileteri, polivinilalcolli.

Esempi di macromolecole naturali comprendono acido ialuronico nativo (HY) e cellulosa.

Esempi di macromolecole naturali semisintetiche comprendono le carbossialchilcellulose, molto utilizzate anche in campo alimentare e industrie della cura personale.

Queste macromolecole sono caratterizzate da una struttura prevalentemente lineare o scarsamente ramificata.

Una modifica molto importante ai fini di aumentare la stabilità chimica, enzimatica e meccanica è la reticolazione, che può essere realizzata sia su polimeri sintetici sia su polimeri naturali (più o

meno già modificati).

Esempi di polimeri reticolati comprendono i polimeri utilizzati per la gastroprotezione di compresse o capsule (polimetacrilati), così come polimeri usati come emulsificanti, sospendenti, indurenti per compresse (Carbopol), acidi ialuronici reticolati, che saranno discussi più avanti.

Per le applicazioni previste, e in particolare per la preparazione di dispositivi medico-chirurgici invasivi, che devono essere somministrati per via parenterale, detti polimeri devono rispondere ad una serie di richieste tecniche e/o normative.

Tra le richieste tecniche, le principali sono:

- 1) elevata biocompatibilità;
- 2) modulazione della resistenza ai sistemi enzimatici, sia tissutali sia plasmatici (per le composizioni iniettabili) e gastrointestinali (per le formulazioni orali).

In alcuni casi può essere desiderabile una loro demolizione progressiva, per esempio nel rilascio controllato di un principio attivo.

Tale resistenza è particolarmente importante quando la macromolecola è presente in formulati/manufatti cui si richiede durata nel tempo, quali, ad esempio, sostitutivi del liquido sinoviale, film, spugne o gel come antiadesivi tissutali nei vari tipi di chirurgia; in ingegneria tissutale (organi artificiali); pelli artificiali, nella cura delle ustioni o in genere nella chirurgia estetica;

- 3) un certo grado di lavorabilità in forme diverse (gel, film, spugne,

etc.);

- 4) possibilità di essere sterilizzati per via chimica o fisica senza alterare la struttura del prodotto.

I requisiti regolatori stabiliscono che la composizione tra i vari lotti di produzione deve risultare costante entro limiti assai ristretti; tale fatto impone, ovviamente, che i processi di produzione dei materiali iniziali e dei manufatti finali, siano standardizzati e che i componenti di base abbiano una variabilità intrinseca molto bassa.

Un possibile fattore di disomogeneità per le macromolecole deriva dalla dispersione dei pesi molecolari. Tale disomogeneità è spesso aggravata dal processo di reticolazione. Ciò può essere un grave inconveniente a seconda del campo di utilizzo e delle finalità applicative del prodotto finale.

EP-A-0566118A7 (Kimberly-Clark) rivendica polisaccaridi reticolati per uso come super-assorbenti in pannolini per bambini e articoli simili.

La metodologia ivi descritta si basa sulla reticolazione di cellulosa mediante formazione di esteri, eteri o amidi intermolecolari tra poliammine, polioli o miscele di essi e i gruppi carbossilici dei polisaccaridi.

La reazione è effettuata per riscaldamento al di sopra di 80°C della miscela di polisaccaride con poliolo e/o poliammina. Questo processo è certamente economico e adatto alla produzione su vasta scala, dove i requisiti di riproducibilità sono meno severi.

US 465055 rivendica polisaccaridi reticolati (acido ialuronico ed



acido alginico) ottenuti mediante reazione dei gruppi -COOH e -OH del polisaccaride stesso, senza inserzione di bracci reticolanti.

WO91/09119 descrive microcapsule per incapsulare isolette di Langerhans come organi bioibridi, a base di acido alginico, reticolato con ioni bario.

EP 0190215 descrive la reticolazione di vari polimeri (carbossimetil-amido, destrano, cellulose) con agenti tipo epossidi di- o polifunzionali.

Sono stati proposti i seguenti agenti reticolanti per acidi ialuronici:

epossidi polifunzionali sono descritti in US 4716224, 4772419, 4716154;

polialcoolli sono descritti in US 4957744;

divinilsulfone è descritto in US 4582865, 4605691, 4636524;

aldeidi sono descritte in US 4713448 e 4582865;

carbossammidi sono descritte in US 5356833;

acidi policarbossilici sono descritti in EP-A-718312.

Descrizione dell'invenzione

La presente invenzione ha per oggetto un processo per la preparazione di polisaccaridi reticolati contenenti gruppi carbossilici, che consente il completo controllo del grado di reticolazione così come un'elevata riproducibilità in termini di caratteristiche costanti del prodotto finale.

Il processo dell'invenzione comprende:

- a) attivazione dei gruppi carbossilici del polisaccaride per reazione con adatti reagenti carbossi-attivanti in solvente aprotico anidro;

b) reazione del polisaccaride attivato ai gruppi carbossilici con una poliammina.

Il polisaccaride reticolato ottenuto, se desiderato, può essere sottoposto a solfatazione o emisuccinilazione dei gruppi idrossi liberi.

I prodotti reticolati ottenibili dal processo dell'invenzione possono anche essere complessati con ioni metallici quali ioni rame, zinco, ferro.

Il polisaccaride contenente gruppi carbossilici che può essere utilizzato secondo l'invenzione può essere di origine naturale, sintetica o semisintetica. Esempi di tali polisaccaridi comprendono acidi ialuronici (estratti da batteri o da tessuti), carbossimetildestrano, carbossimetilcellulosa, carbossimetil amido, acidi alginici, acido cellulosico, N-carbossi-metil- o butil-glucani o chitosani; eparine a diversi pesi molecolari, eventualmente desolfatate e succinilate, dermatansolfati, condroitinsolfati, eparansolfati, acidi poliacrilici.

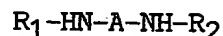
Sono particolarmente preferiti acidi ialuronici, carbossimetilcellulose, eparine, acidi alginici e acidi poliacrilici.

Tali polimeri, ottenuti con metodi diversi, sono noti e sono stati proposti per svariati usi (vedi per esempio EP 566118, WO91/9119, US 5465055, EP 190215, EP 718312, US 4716224 discussi in precedenza).

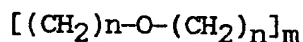
Gli agenti attivanti i gruppi carbossilici, sono quelli normalmente usati nella sintesi dei peptidi, esempi di agenti adatti comprendono carbonildiimidazolo, carboniltriazolo, clorometilpiridilio ioduro (CMP-J), idrossibenzotriazolo, p-nitrofenolo + p-nitrofeniltrifluoroacetato,

N-idrossisuccinimide e simili. E' particolarmente preferito il clorometilpiridilio ioduro.

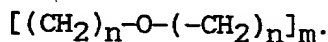
Le poliammine hanno preferibilmente la seguente formula generale:



dove R_1 e R_2 , che sono uguali o diversi, sono idrogeno, gruppi C_1-C_6 alchile, fenile o benzile, A è una catena C_2-C_{10} alchilenica lineare o ramificata, una catena C_2-C_6 , eventualmente sostituita da gruppi idrossi, carbossi, alogeno, alcossi ed ammino; una catena poliossialchilenica di formula



dove n è 2 o 3 e m è un intero da 2 a 10; un gruppo C_5-C_7 cicloalchilico; un gruppo arilico o etarilico, preferibilmente benzene 1,4 o 1,3- disostituito. A è preferibilmente una catena alchilene lineare C_2-C_6 o una catena di formula



La reazione di reticolazione è preferibilmente effettuata in un solvente scelto tra tetraidrofurano o dimetilformamide, e il polisaccaride è preferibilmente salificato con un catione lipofilo, ad esempio tributil- o tetralchilammonio o altre basi organiche lipofile.

La trasformazione da sali inorganici, quali quello sodico, in sali di cationi organici lipofili, può essere effettuata mediante note tecniche di scambio ionico in fase omogenea o per precipitazione del componente acido, suo recupero e successiva salificazione con la base organica prescelta.

La reazione di attivazione dei gruppi carbossilici viene condotta

in fase omogenea e in solvente aprotico polare anidro.

La poliammina diluita nello stesso solvente anidro, è aggiunta alla soluzione dell'estere attivato, mantenendo la temperatura tra 0° e 30°C. I tempi di reazione di reticolazione variano tra 1 e 12 ore, anche in funzione di eventuale presenza di opportune sostanze basiche (ad esempio trietilammina).

In generale, il prodotto finale desiderato è recuperato per precipitazione del sale organico, per aggiunta di un diverso solvente al solvente di reazione o suo allontanamento sotto vuoto, successiva centrifugazione, lavaggi con acqua distillata, dispersioni ripetute nelle soluzioni dell'alcali desiderato (ad esempio sodio, potassio), lavaggi successivi con acqua ed essiccamento finale del sale alcalino sotto vuoto o per liofilizzazione.

Il grado di reticolazione può variare entro ampi limiti e può essere controllato variando la quantità di agente attivante i gruppi carbossilici, essendo la reazione d'attivazione e quella di reticolazione con la poliammina praticamente quantitative.

I polisaccaridi reticolati ottenuti secondo l'invenzione possono essere sottoposti a reazione di solfatazione degli eventuali gruppi OH presenti, tipicamente per reazione col complesso piridina/triossido di zolfo in dimetilformammide.

La reazione viene effettuata in fase eterogenea ad una temperatura di 0-10°C per tempi compresi tra 0,5 e 6 ore circa.

Il grado di solfatazione ottenibile può variare entro ampi limiti rispetto al totale dei gruppi idrossilici e può essere controllato



variando il tempo di reazione e la temperatura. In genere il grado di solfatazione (espresso come equivalenti di gruppi solfato/g) può variare da 1×10^{-6} a 6×10^{-6} , preferibilmente è di 2×10^{-6} eq./gr per un G.R. = 0,5.

I polimeri reticolati ottenuti secondo l'invenzione, eventualmente anche solfatati, sono in grado di complessare ioni metallici quali ioni zinco, rame e ferro, etc..

Tali complessi possono essere ottenuti dissolvendo o disperdendo il prodotto in acqua fino a rigonfiamento completo ed aggiungendo sotto agitazione, preferibilmente a temperatura ambiente, una soluzione concentrata di un sale metallico inorganico o organico, per esempio CuCl_2 , ZnCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; dopo agitazione per 12-24 ore, il complesso è recuperato per centrifugazione o per precipitazione a seguito di variazione di solvente (ad esempio etanolo o acetone), o evaporazione s.v.; il grezzo recuperato è lavato abbondantemente con acqua distillata, onde eliminare l'eccesso di ioni. I complessi sono quindi liofilizzati. Il contenuto di ioni metallici varia, in funzione delle condizioni operative adottate, in particolare rapporti molari tra polimero e ione, concentrazione e pH delle soluzioni; tempi di reazione e soprattutto grado di reticolazione. Esso può raggiungere un massimo di 1 ione metallico per unità disaccaridica non coinvolta nella reticolazione.

Il processo della presente invenzione, variando opportunamente il grado di reticolazione e/o il grado di solfatazione, permette la preparazione di polisaccaridi carbossilati reticolati in un' ampia gamma

di forme diverse, caratterizzate da diverse proprietà, quali viscoelasticità, grado di idratabilità, capacità complessanti verso ioni metallici, capacità di formare idrogel; lavorabilità in film, e/o spugne; resistenza meccanica etc.) dei materiali finali.

Ciò rende possibile la loro applicazione in molti settori farmaceutico-medicali, nel campo umano e veterinario, ed in dermocosmetologia.

I seguenti esempi illustrano l'invenzione in maggiore dettaglio.

ESEMPIO 1: Carbossimetilcellulosa gel reticolato con 1,3 diamminopropano al 100%.

0,60 g di carbossimetil cellulosa sale di TBA ($6,5 \times 10^{-4}$ moli riferiti all'unità disaccaridica) vengono sciolti in 30 ml di DMF sotto N_2 e con agitazione.

0,32 g di clorometilpiridilioduro ($1,2 \times 10^{-3}$ moli) sciolti in 2 ml di DMF vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione mantenuta alla temperatura di $0^\circ C$ con ghiaccio.

Il rapporto molare è di 1 a 2 dal momento che la carbossimetil cellulosa ha due gruppi funzionali carbossilici per unità disaccaridica. Dopo 20 minuti si aggiungono alla soluzione 2 ml di reticolante 1,3 diamminopropano (0,024 moli), e subito dopo si aggiungono anche 0,5 ml di trietilammina. Si forma un prodotto solido di aspetto gelatinoso che viene lavato con DMF, poi posto in H_2O e si aspetta che rigonfi completamente.

Altri lavaggi vengono poi effettuati con EtOH alternati a lavaggi con H_2O . Dopo l'ultimo lavaggio con EtOH il prodotto viene liofilizzato.

ESEMPIO 2: Carbossimetil glucano gel reticolato con 1,3-diamminopropano al 100%.

0,60 g di carbossimetil cellulosa sale di TBA ($9,6 \times 10^{-4}$ moli riferiti all'unità disaccaridica) vengono sciolti in 30 ml di DMF sotto N_2 e con agitazione.

0,24 g di clorometilpiridilio ioduro ($1,2 \times 10^{-3}$ moli) sciolti in 2 ml di DMF vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione mantenuta alla temperatura di $0^\circ C$ con ghiaccio. Il rapporto molare è di 1/1.

Dopo 20 minuti si aggiungono alla soluzione 2 ml di reticolante 1,3-diamminopropano (0,024 moli), e subito dopo si aggiungono anche 0,5 ml di trietilammina. Si forma un prodotto solido di aspetto gelatinoso che viene lavato con DMF, quindi posto in H_2O e si aspetta che rigonfi completamente.

Altri lavaggi vengono poi effettuati con EtOH alternati a lavaggi con H_2O . Dopo l'ultimo lavaggio con EtOH il prodotto viene liofilizzato.

ESEMPIO 3: Acido Alginico gel reticolato con 1,3-diamminopropano al 100%.

0,60 g di alginato di TBA ($1,43 \times 10^{-3}$ moli riferiti all'unità monosaccaridica) vengono sciolti in 30 ml di DMF sotto N_2 e con agitazione.

0,36 g di clorometilpiridilio ioduro ($1,43 \times 10^{-3}$ moli) sciolti in 2 ml di DMF vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione mantenuta alla temperatura di $0^\circ C$ con ghiaccio. Il rapporto molare è di 1/1.

Dopo 20 minuti si aggiungono alla soluzione 2 ml di reticolante 1,3-diamminopropano (0,024 moli), e subito dopo si aggiungono anche 0,5

ml di trietilammina. Si forma un prodotto solido di aspetto gelatinoso che viene lavato con DMF, quindi posto in H_2O e si aspetta che rigonfi completamente.

Altri lavaggi vengono poi effettuati con EtOH alternati a lavaggi con H_2O . Dopo l'ultimo lavaggio con EtOH il prodotto viene liofilizzato.

ESEMPIO 4: Preparazione di un acido ialuronico con G.R. = 0,05 (5% dei gruppi carbossilici inizialmente disponibili). Agente reticolante: 1,3-propandiammina.

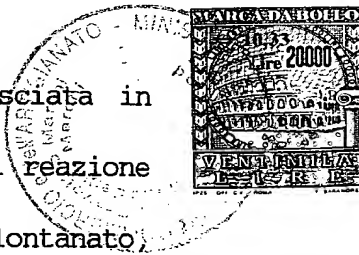
Agente attivante: clorometilpiridilio ioduro.

0,6 g di acido ialuronico sotto forma di sale di tetrabutylammonio (1×10^{-3} moli, riferiti all'unità disaccaridica), vengono dissolti in 15 mL di DMF anidra, sotto azoto ed agitazione meccanica o magnetica.

Si aggiungono, quindi, goccia a goccia ed a circa $0^\circ C$, G.O,02 di clorometilpiridilio ioduro dissolti in 2 mL di DMF anidra. La miscela di reazione è quindi addizionata di 0,1 ml di trietilammina e quindi, goccia a goccia, con una soluzione di 1,3-diamminopropano ($d=0,88$; in largo eccesso, per favorire la reticolazione del 100% dei carbossili attivati) in 2 ml di DMF anidra.

Ad aggiunta ultimata, la miscela di reazione viene lasciata in agitazione per almeno 30' e quindi si allontana il solvente di reazione s.v.; il residuo allora è ripreso più volte con DMF, allontanato successivamente, per distillazione; quindi, il residuo dell'ultimo trattamento è ripreso con etanolo, etanolo-acqua ed, in ultimo, con acqua.

La soluzione viscosa è sottoposta a liofilizzazione. Il residuo



secco è passato all'analisi.

ESEMPIO 5: Preparazione di acido ialuronico reticolato con G.R. = 0,05 (5% dei gruppi carbossilici inizialmente disponibili). Agente reticolante: 1,6-diamminoesano.

Agente attivante: clometilpiridilio ioduro.

Seguendo la metodologia e le condizioni esposte nell'esempio 4, utilizzando lo stesso attivante, ma 1,6-diamminoesano anziché 1,3-diamminopropano, si ottiene il derivato reticolato.

ESEMPIO 6: Preparazione di acido ialuronico reticolato, con G.R. = 0,05 (5% dei gruppi carbossilici inizialmente disponibili). Agente reticolante: 0,0'-bis-(2-amminopropil) PEG800. Agente attivante: clorometilpiridilio ioduro

Seguendo la metodologia e le condizioni esposte nell'esempio 4 ed utilizzando lo stesso attivante, ma 0,0'-bis-(2-amminopropil) PEG800 anziché 1,3-diamminopropano, si ottiene il derivato reticolato.

ESEMPIO 7: Preparazione di acidi ialuronici reticolati, con G.R.= 0,3 (30% dei gruppi carbossilici inizialmente disponibili). Agente reticolante: 1,3-propandiammina. Agente attivante: clorometilpiridilio ioduro.

0,6 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (1×10^{-3} moli riferiti all'unità disaccaridica) vengono sciolti in 30 ml di DMF sotto N_2 e con agitazione.

0,09 g di clorometilpiridilio ioduro ($3,5 \times 10^{-4}$ moli) sciolti in 2 ml di DMF vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione mantenuta alla temperatura di $0^\circ C$ con ghiaccio. Il rapporto molare diventa così circa

3/1.

Dopo 20 minuti si aggiungono alla soluzione 2 ml di reticolante 1,3-diamminopropano (0,024 moli), e subito dopo si aggiungono anche 0,5 ml di trietilammina.

Si forma un prodotto solido, di aspetto gelatinoso che viene ripetutamente lavato con DMF, quindi posto in H₂O e si aspetta che rigonfi completamente. Altri lavaggi vengono poi effettuati con EtOH. Il prodotto finale viene liofilizzato.

Il prodotto ottenuto mostra all'analisi al microscopio a scansione un aspetto irregolare con zone lisce alternate a zone spugnose.

IR(cm⁻¹): 1795, 1660, 1610 e 1550.

ESEMPIO 8: Preparazione di acido ialuronico reticolato con G.R.=0,5 (50% dei gruppi carbossilici inizialmente disponibili). Agente reticolante: 1,3-propandiammina. Agente attivante: clorometilpiridilio ioduro.

0,6 G di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (1x10⁻³ moli riferito all'unità disaccaridica) vengono sciolti in 30 ML di DMF sotto azoto e con agitazione.

0,15 g di clorometilpiridilio ioduro (6x10⁻⁴ moli) sciolti in 2 ml di DMF vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione, mantenuta a temperatura di 0°C con ghiaccio. Il rapporto molare diventa così circa 2 HY TBA/1CMPJ.

Dopo 20 minuti si aggiungono alla soluzione 2 ml di reticolante 1,3-diamminopropano (0,024 moli), e subito dopo si aggiungono 0,5 ml di trietilammina.

Si forma un prodotto solido, di aspetto gelatinoso che viene ripetutamente lavato con DMF. Eliminato il DMF, il prodotto si pone in H₂O e si aspetta che rigonfi completamente. Altri lavaggi vengono poi effettuati con EtOH. il prodotto finale viene liofilizzato.

Il prodotto ottenuto mostra all'analisi al microscopio a scansione un aspetto granuloso intervallato da larghe maglie. Ad ingrandimenti maggiori le due morfologie risultano uguali e presentano delle protrusioni rotondeggianti con diametro di pochi μm .

IR (cm^{-1}): 1755, 1660, 1610 e 1550.

Il gel è stato sottoposto a rigonfiamento in PBS e si è valutata la sua massima capacità di rigonfiamento. Questa, espressa come g H₂O assorbiti/g gel secco, risulta uguale a 37 dopo 15' e si mantiene costante nel tempo.

Le proprietà reologiche valutate su un Bohlin VOR Rheometer, alla temperatura di $23^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, indicano che il modulo dinamico elastico G' (100Pa a 10Hz) uguale alle due concentrazioni considerate (10 e 20 mg/ml) è sempre più alto del modulo dinamico viscoso (G'' 40Pa per 20 mg a 10Hz e 20 Pa per 10 mg a 10Hz).

ESEMPIO 9: Preparazione di acido ialuronico reticolato con G.R.=1 (100% di gruppi carbossili inizialmente disponibili). Agente reticolante: 1,3-propandiammina. Agente attivante: clorometilpiridilio ioduro.

0,6 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (1×10^{-3} moli riferiti all'unità disaccaridica) vengono sciolti in 30 ML di DMF sotto N₂ e con agitazione.

0,30 g di clorometilpiridilio ioduro ($1,2 \times 10^{-3}$ moli) sciolti in 2 ml di DMF vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione mantenuta alla temperatura di 0°C con ghiaccio. Il rapporto molare diventa così circa 1/1.

Dopo 20 minuti si aggiungono alla soluzione 2 ml di reticolante 1,3-diamminopropano (0,024 moli), e subito dopo si aggiungono anche 0,5 ml di trietilammina.

Si forma un prodotto solido, di aspetto gelatinoso che viene ripetutamente lavato con DMF, quindi posto in H_2O e si aspetta che rigonfi completamente. Altri lavaggi vengono poi effettuato in EtOH.

Il prodotto finale viene liofilizzato.

Il prodotto ottenuto mostra all'analisi al microscopio a scansione una morfologia omogenea caratterizzata da pieghe.

ESEMPIO 10: Preparazione di acido ialuronico reticolato con G.R.=0,5 (50% dei gruppi carbossilici inizialmente disponibili). Agente reticolante: 0,01-bis (2amminopropil)-PEG500. Agente attivante: clorometilpiridilio ioduro.

0,6 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (1×10^{-3} moli riferiti all'unità disaccaridica) vengono sciolti in 30 ML di DMF sotto N_2 e con agitazione.

0,15 g di clorometilpiridilio ioduro ($6,0 \times 10^{-4}$ moli) sciolti in 2 ml di DMF vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione mantenuta alla temperatura di 0°C con ghiaccio. Il rapporto molecolare diventa così circa 2/1.

Dopo 20 minuti si aggiungono alla soluzione 13,4 ml di reticolante



0,0'-bis (2-amminopropil)-PEG500 (0,022 moli), e subito dopo si aggiungono anche 0,5 ml di trietilammina.

Si forma un prodotto solido, di aspetto gelatinoso che viene ripetutamente lavato con DMF, quindi posto in H₂O e si aspetta che rigonfi completamente. Altri lavaggi vengono poi effettuati con EtOH. Il prodotto finale viene liofilizzato.

La superficie, come si vede dall'analisi al microscopio a scansione, anche se macroscopicamente presenta zone lisce e a maglie, ad ingrandimenti maggiori è completamente caratterizzata dalla presenza di protrusioni di forma circolare con diametro di pochi μm .

Il gel presenta un rigonfiamento in PBS che può essere valutato uguale a 36 g H₂O assorbiti/g gel secco dopo 3 minuti. Questo valore si mantiene costante anche dopo 60 minuti.

ESEMPIO 11: Preparazione di acido ialuronico reticolato con G.R.=0,5 (50% dei gruppi carbossilici inizialmente disponibili). Agente reticolante: 0,0'-bis (2 amminopropil)-PEG800. Agente attivante: clorometilpiridilio ioduro.

0,6 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (1×10^{-3} moli riferiti all'unità disaccaridica) vengono sciolti in 30 ML di DMF sotto N₂ e con agitazione.

0,15 g di clorometilpiridilio ioduro (6×10^{-4} moli) sciolti in 2 ml di DMF vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione mantenuta alla temperatura di 0°C con ghiaccio. Il rapporto molare diventa così circa 2/1.

Dopo 20 minuti si aggiungono alla soluzione 19,9 ml di reticolante

O,O'-bis (2amminopropil)-PEG800 (0,022 moli), e subito dopo si aggiungono anche 0,54 ml di trietilammina.

Si forma un prodotto solido, di aspetto gelatinoso che viene ripetutamente lavato con DMF, quindi posto in H₂O e si aspetta che rigonfi completamente. Altri lavaggi vengono poi effettuati con EtOH.

Il prodotto finale viene liofilizzato.

La superficie del prodotto presenta, all'analisi al microscopio a scansione, due zone morfologicamente ben distinte: una caratterizzata da strutture simili a fori, l'altra ondulata.

Il gel rigonfia in PBS, la sua capacità massima di assorbire H₂O risulta uguale a: 36 g H₂O assorbiti/g gel secco dopo 5 minuti e si mantiene costante per più di 1 ora.

ESEMPIO 12: Preparazione di acido ialuronico reticolato con G.R.=0,5 (50% dei gruppi carbossilici inizialmente disponibili). Agente reticolante: 1,6-diamminoesano. Agente attivante: clorometilpiridilio ioduro.

Seguendo la metodologia e le condizioni esposte nell'esempio 11, ma usando 2,8 g di 1,6-diamminoesano (0,023 moli) come agente di reticolazione anziché 19,9 ml di O,O'-bis (2amminopropil)-PEG800, si ottiene il derivato reticolato desiderato.

Il prodotto ottenuto mostra all'analisi al microscopio a scansione una superficie liscia con protrusioni a forma variabile di pochi µm.

Il gel presenta un rigonfiamento in PBS che può essere valutato uguale a 37 g H₂O assorbiti/g gel secco dopo 10 minuti. questo valore si mantiene costante per più di 1 ora.

Le proprietà Reologiche indicano un modulo dinamico elastico (G') più alto (2000 Pa con 20 mg e 1000 Pa con 10 mg a 10Hz) del modulo dinamico viscoso G'' (250 Pa con 20 mg e 200 Pa con 10 mg a 10Hz).

ESEMPIO 13: Solfatazione dello HY reticolato con 1,3-propandiammina al 50% ($G.R.=0,5$)

0,6 g di prodotto reticolato e liofilizzato ottenuto secondo l'esempio 9, vengono dispersi in 5 ml di DMF sotto forte agitazione e sotto N_2 . Si aggiunge una soluzione di SO_3 piridina, 1 g in 1 ml DMF, a $0^\circ C$ e si tiene in agitazione per 3 ore. La reazione viene bloccata per aggiunta di un eccesso di H_2O (50 ml) e quindi portando il pH a 9 con NaOH 0,1 M.

Il prodotto viene lavato abbondantemente con etanolo ed H_2O poi liofilizzato.

Il prodotto mostra in presenza del colorante blu di toluidina una netta colorazione viola, indice della presenza di gruppi solfato. Inoltre, l'analisi del prodotto secco mostra la presenza di S (analisi EDAX).

Il prodotto ottenuto mostra all'analisi al microscopio a scansione un aspetto concorde con quello ottenuto sul campione non solfatato.

IR (cm^{-1}): 1250, 1000.

Il gel presenta un rigonfiamento in PBS. La sua capacità di rigonfiamento risulta essere 44 g H_2O assorbiti/g gel secco dopo 15 minuti e si mantiene costante nel tempo.

Il gel polimerico solfatato è stato analizzato mediante Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) ad alta risoluzione.

I chemical shift ottenuti a 37°C in acqua deuterata sono in tabella.

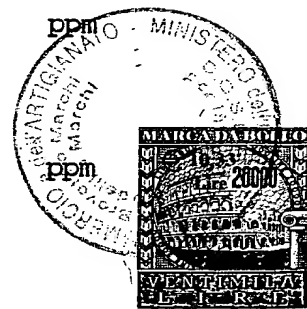
L'intensità dei segnali a 29,3 e 39,8 ppm attribuibili ai CH₂ del gruppo reticolante ed il segnale a 172,5 ppm attribuibile ai gruppi carbossilici impegnati nella reticolazione permettono di individuare un grado di reticolazione del 50% in accordo con quello ipotizzato dalla stechiometria di reazione.

Le proprietà reologiche indicano un modulo dinamico elastico G' (2500 Pa con 20 mg e 1000 Pa con 10 mg alla frequenza di 10Hz) sempre più alto del modulo dinamico viscoso G'' (600 Pa con 20 mg e 150 Pa con 10 mg alla frequenza di 10Hz) e molto più alti dei corrispondenti valori ottenuti con HY (reticolato al 50% - Es. 9) non solfatato.

Questo composto presenta inoltre un tempo di trombina (TT) più alto (61,1") rispetto al controllo (14,0") e al corrispondente non reticolato (14,6"). Inoltre le fotografie al microscopio elettronico indicano la mancata adesione delle piastrine provenienti da prp da coniglio stressato.

TABELLA: Chemical shift 13C del polimero acido ialuronico reticolato e solfatato rigonfiato in D₂O a 37°C.

| C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | x-C=O | y-CH ₃ | |
|-------------------|-------------------|-------------------|--------|---------------|--------|-------------------|-----|
| 103,5 | 57,3 | 85,4 | 71,3 | 78,7 | 178,0 | 25,3 | ppm |
| C-1' | C-2' | C-3' | C-4' | C-5' | 6'-C=O | | |
| 105,9 | 75,2 | 76,4 | 82,8 | 78,6 | 176,2 | | |
| 1-CH ₂ | 2-CH ₂ | 3-CH ₂ | 6'-C=O | reticolazione | | | |
| 39,8 | 29,3 | 39,8 | 172,5 | | | | |



ESEMPIO 14: Solfatazione di Acido Alginico GEL

Il prodotto reticolato dopo essere stato in EtOH viene liofilizzato per eliminare completamente l'umidità e sottoposto alla solfatazione dei gruppi alcolici.

A 100 mg di prodotto reticolato disperso in 5 ml di DMF viene aggiunta una soluzione di SO₃-piridina (800 mg in 2 ml di DMF). La reazione deve avvenire a 0°C, sotto azoto e sotto agitazione costante per 2 ore.

E' di fondamentale importanza che il prodotto non assorba umidità che inibisce la reazione.

Dopo 2 ore aggiungere EtOH; la solfatazione è quindi bloccata per neutralizzazione del reattivo solfatante con H₂O. Portare a pH = 9 per mezzo di una soluzione 1M di NaOPH ottenendo così la liberazione di piridina.

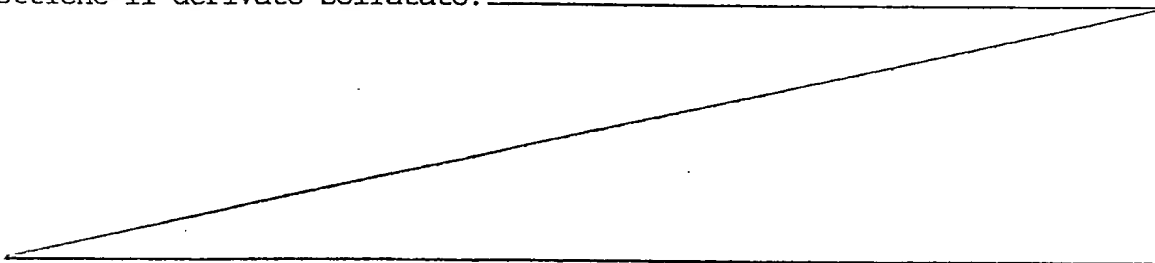
Il prodotto così solfatato viene messo a purificare in EtOH.

ESEMPIO 15: Solfatazione di Carbossimetil glucano GEL

Seguendo la metodologia e le condizioni esposte nell'esempio 14, si ottiene il derivato solfatato.

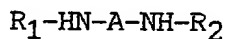
ESEMPIO 16: Solfatazione di Carbossimetil cellulosa GEL

Seguendo la metodologia e le condizioni esposte nell'esempio 14, si ottiene il derivato solfatato.



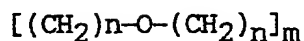
RIVENDICAZIONI

1. Processo per la preparazione di polisaccaridi reticolati contenenti gruppi carbossilici, comprendente:
 - a) attivazione dei gruppi carbossili del polisaccaride per reazione con adatti reagenti carbossi-attivanti in solvente aprotico anidro;
 - b) reazione del polisaccaride attivato ai gruppi carbossilici con una poliammina.
2. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui il polisaccaride è scelto tra acidi ialuronici (estratti da batteri o da tessuti), carbossimetildestrano, carbossimetilcellulosa, carbossimetilamido, acidi alginici, acido cellulosico, N-carbossi-metil- o butil-glucani o chitosani; eparine a diversi pesi molecolari, eventualmente desolfatate e succinilate, dermatansolfati, condroitinsolfati, eparansolfati, acidi poliacrilici.
3. Processo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il reagente carbossi-attivante è scelto tra carbonildiimidazolo, carboniltriangolo, clorometilpiridilio ioduro (CMP-J), idrossibenzotriangolo, p-nitrofenolo + p-nitrofeniltrifluoroacetato, N-idrossisuccinimide.
4. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui le poliammine hanno preferibilmente la seguente formula generale:



dove R_1 e R_2 , che sono uguali o diversi, sono idrogeno, gruppi C_1-C_6 alchile, fenile o benzile, A è una catena C_2-C_{10} alchilenica lineare o

ramificata, una catena C₂-C₆, eventualmente sostituita da gruppi idrossi, carbossi, alogeno, alcossi ed ammino; una catena poliossialchilenica di formula



dove n è 2 o 3 e m è un intero da 2 a 10; un gruppo C₅-C₇ cicloalchilico; un gruppo arilico o etarilico, preferibilmente benzene 1,4 o 1,3- disostituito.

5. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il polisaccaride è salificato con cationi lipofili.

6. Processo secondo la rivendicazione 5, in cui il catione lipofilo è tributil- o tetralchilammonio.

7. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui la reazione di reticolazione è effettuata in dimetilformammide o tetraidrofurano anidri.

8. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui il polisaccaride reticolato è sottoposto ulteriormente a reazione di solfatazione dei gruppi idrossi per reazione col complesso piridina/triossido di zolfo.

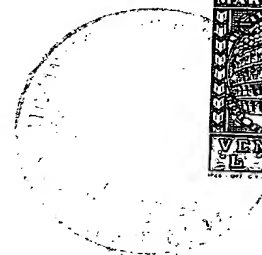
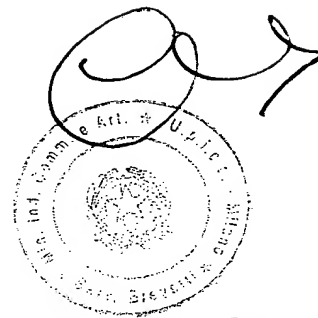
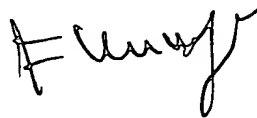
9. Processo secondo la rivendicazione 8, in cui la reazione di solfatazione viene effettuata in fase eterogenea in dimetilformammide ad una temperatura di 0-10°C per tempi compresi tra 0,5 e 6 ore.

10. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui il polisaccaride reticolato, eventualmente solfatato, è sottoposto ulteriormente a reazione di complessazione con soluzioni acquose di ioni di zinco, rame e ferro.

11. Polisaccaridi reticolati ottenibili con il processo secondo le rivendicazioni da 1 a 10.

Milano, 11 novembre 1998

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.



7
a
v
7

7
b
7
7